

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* ПРИ ПОЛУЧЕНИИ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РИСА

Н.Г. Черткова, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, tycik17082012@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-4005-9771;

Н.В. Калинина, научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, kalinina74783@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-2305-4189;

В.Ю. Донцова, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, valja-doncova@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-1083-9881;

П.И. Костылев, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник лаборатории селекции и семеноводства риса, p-kostylev@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4371-6848

ФГБНУ Аграрный научный центр «Донской», 347740, Ростовская обл., г. Зерноград, ул. Научный городок, д. 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

Рис является одной из важных продовольственных культур, которая используется в питании большой части населения Земли. Применение метода культуры пыльников *in vitro* позволяет за 1–2 года получить гомозиготное потомство и генетически уникальный материал. Целью работы является оценка показателей эффективности культивирования пыльников и получение удвоенных гаплоидов риса. Количество сформировавшихся каллусов в пределах гибридов варьировало от 0 до 819 шт. Частота каллусообразования изменялась от 0 до 115 %. Установлено, что сформировали каллус 11 гибридов риса (61 %). В процессе культивирования каллусов на регенерационной среде получено 137 зеленых и 108 альбиносных растений. Наблюдалась низкая частота регенерации растений-регенерантов – 1,6 %. Наибольшее количество каллусов и высокий выход растений-регенерантов обнаружено у трех гибридов: Классик x Вирасан – 568 и 23 шт., Рапан 2 x Аргамак – 358 и 32 шт. и IR86385-248-2-1-B x Контакт – 819 и 152 шт. соответственно. Наибольшее количество растений-регенерантов после адаптации в почве получено у гибридного образца IR86385-248-2-1-B x Контакт (41 шт.), в том числе 4 шт. – удвоенные гаплоиды, а остальные 37 шт. – гаплоиды. Удвоенные гаплоидные растения-регенеранты сформировали метелки с высокой fertильностью (84,5 %). В дальнейший селекционный процесс включены линии IR86385-248-2-1-B x Контакт и Рапан 2 x Аргамак.

Ключевые слова: рис (*O. sativa L.*), культура пыльников *in vitro*, андрогенез, гаплоиды, удвоенные гаплоиды, тетраплоиды.

Для цитирования: Черткова Н.Г., Калинина Н.В., Донцова В.Ю., Костылев П.И. Оценка эффективности андрогенеза *in vitro* при получении удвоенных гаплоидов риса // Зерновое хозяйство России. 2025. Т. 17, № 6. С. 47–55. DOI: 10.31367/2079-8725-2025-101-6-47-55.



ESTIMATION OF EFFICIENCY OF *IN VITRO* ANDROGENESIS IN THE PRODUCTION OF DOUBLED RICE HAPLOIDS

N.G. Chertkova, junior researcher of the laboratory for cell breeding, tycik17082012@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-4005-9771;

N.V. Kalinina, researcher of the laboratory for cell breeding, kalinina74783@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-2305-4189;

V.Yu. Dontsova, junior researcher of the laboratory for cell breeding, valja-doncova@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-1083-9881;

P.I. Kostylev, Doctor of Agricultural Sciences, main researcher of the laboratory for rice breeding and seed production, p-kostylev@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4371-6848

FSBSI Agricultural Research Center “Donskoy”, 347740, Russia, Rostov region, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; email: vniizk30@mail.ru

Rice is an important food crop, used to feed a large portion of the world's population. The use of *in vitro* anther culture makes possible to develop homozygous offspring and genetically unique material within 1–2 years. The purpose of the current study was to estimate the efficiency of anther cultures and the production of doubled rice haploids. The number of calli formed within the hybrids ranged from 0 to 819. The callus formation rate varied from 0 to 115 %. There has been found that eleven rice hybrids (61 %) formed callus. During callus cultivation on regeneration medium, there have been developed 137 green and 108 albino plants. There was a low regeneration rate of 1.6% among the regenerated plants. The largest number of calli and large productivity of regenerated plants were found in such three hybrids as 'Klassik x Virasan' with 568 and 23 pcs., 'Rapan 2 x Argamak' with 358 and 32 pcs. and 'IR86385-248-2-1-B x Kontakt' with 819 and 152 pcs., respectively. The largest number of regenerated plants after adaptation in soil was obtained from the hybrid sample 'IR86385-248-2-1-B x Kontakt' (41 pcs.), including 4 doubled haploids, and the remaining 37 haploids. Doubled haploid regenerated plants have formed panicles with high fertility (84.5%). The lines 'IR86385-248-2-1-B x Kontakt' and 'Rapan 2 x Argamak' were included in the further breeding process.

Keywords: rice (*O. sativa L.*), *in vitro* anther culture, androgenesis, haploids, doubled haploids, tetraploids.

Введение. Рис (*O. sativa L.*) является одной из важных продовольственных культур, кото- рую использует в питании большая часть населения Земли (Куум et al., 2021). Селекционеры

из разных стран активно разрабатывают инновационные подходы в выведении новых сортов и гибридов риса, которые будут обладать не только повышенной урожайностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, но также будут получены за более короткий срок (Gao et al., 2024). В зарубежных странах андрогенез *in vitro* широко используется для селекции сельскохозяйственных культур, в том числе риса (Maharani et al., 2020).

Традиционная селекция риса включает в себя скрещивание и отбор, который требует 8–10 поколений для получения чистых линий гетерогенной популяции. По сравнению с традиционными подходами, использование метода культивирования пыльников в селекционной работе позволяет значительно ускорить процесс селекции, получить гомозиготное потомство (удвоенных гаплоидов) и генетически уникальный материал за 1–2 года (Савенко и др., 2022).

Метод культивирования пыльников *in vitro* представляет собой двухуровневый процесс. На первом этапе наблюдается формирование каллусной ткани, которая в дальнейшем трансформируется во второй этап – регенерацию зеленых или альбиносных растений (Tripathy et al., 2019).

Успешное использование метода культуры пыльников в селекции риса зависит от некоторых эндогенных и экзогенных факторов, таких как генотип исходного материала, стадии развития микроспор, холодовой и обеззаражающей предобработки метелки, состава питательных сред для индукции каллуса и регенерации проростков, высокой частоты образования растений-альбиносов (Ahmadi et al., 2020).

В ходе исследований различных видов и подвидов риса ученые Gueye и Ndir пришли к выводу, что *O. glaberrima* демонстрирует более высокую эффективность в образовании каллусной ткани и регенерации по сравнению с *O. sativa* (Gueye and Ndir, 2010). По мнению Tripathy и его коллег, сорта подвида риса *japonica* демонстрируют повышенную чувствительность к каллусообразованию (28 %) по сравнению с сортами подвида *indica* (1,2 %). Сильная генотипическая вариативность в отношении появления растений-регенерантов наблюдалась, как и в случае с высокой частотой образования каллусов, у генотипов *japonica* – от 24,3 до 35,9 %, а у сортов *indica* – от 5,8 до 10 % (Tripathy et al., 2021). Температурный стресс необходим для смены фазы жизненного цикла микроспор. В различных работах рекомендуется температура предобработки 4–13 °C с продолжительностью воздействия 7–28 дней (Савенко, 2022; Илюшко, 2023). Оптимальный состав питательных сред необходимо подбирать экспериментальным путем для каждого генотипа, варьируя содержанием гормонов и углеводов (Tajedini et al., 2022). Таким образом, рациональным подходом является проведение селекционного отбора сор-

тов и линий риса с последующим включением в программы скрещивания образцов, демонстрирующих наилучшую реакцию на андрогенез *in vitro* (Pattnaik et al., 2020).

Целью работы является оценка показателей эффективности культивирования пыльников и получение удвоенных гаплоидов риса.

Материалы и методы исследований.

Исследование проводили в 2024 г. в лаборатории клеточной селекции. Для работы были отобраны 18 образцов риса (гибриды второго поколения и сорта), полученные в лаборатории селекции и семеноводства риса ФГБНУ «АНЦ «Донской». Растения-доноры пыльников выращивали в ОП «Пролетарское». Метелки риса отбирали в фазу выхода в трубку флагового листа, за 2–3 дня до выметывания. Оценку стадии развития микроспор проводили под микроскопом окрашиванием ацетокармином. Срезанные в поле метелки поверхностью стерилизовали 96%-м спиртом в течение 3 мин и выдерживали в сосудах с водой при температуре 5 °C в течение 7–10 дней. После предобработки холодом метелки вынимали из трубок флаговых листьев, разрезали на фрагменты и стерилизовали раствором «Белизна» в соотношении с дистиллированной водой 1:1 в течение 10 мин. Культура пыльников риса включала два последовательных этапа: 1) получение из пыльцевых зерен новообразований (эмбрионов или каллусов) на индукционной среде с регуляторами роста; 2) развитие из новообразований целых растений на регенерационной среде. Пыльники инокулировали в пробирки, содержащие 15–20 мл индукционной среды Блейдса с добавлением 30 г/л сахарозы; мио-инозита – 100 мг/л; агара – 8 г/л; 2,4-D – 2 мг/л. Пробирки с пыльниками 3–4 недели инкубировали в темноте при температуре 25–27 °C до появления первых эмбрионоподобных структур. После 30–50 дней инкубации новообразования, достигшие размеров 1 мм и более, переносили на регенерационную среду Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением сахарозы – 20 г/л, мио-инозита – 100 мг/л, агара – 8 г/л, НУК – 1 мг/л и кинетина – 5 мг/л с последующим пассажем на безгормональную среду. Регенерация растений проходила при 12-часовом световом периоде, освещенности 2 тыс. Лк и температуре 22–25 °C. Для оценки эффективности культуры пыльников проводили учет по показателям: количество новообразований (эмбрионоподобных структур и каллусов) на 100 изолированных пыльников; количество морфогенных каллусов на 100 новообразований, общее количество растений на 100 изолированных пыльников; количество альбиносных растений на 100 новообразований; количество зеленых растений на 100 новообразований. Статистическая обработка данных была выполнена средствами программного пакета Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Андрогенную способность образцов риса в культуре пыльников *in vitro* оценивали по интенсивности

каллусообразования – способности пыльников образовывать андрогенные структуры (каллусы, эмбриоиды). Этот показатель важен для селекции риса, так как позволяет получать гаплоидные растения, а на их основе – гомозиготные линии. В результате эксперимента из метелок

риса извлечено и инокулировано на питательную среду 15722 пыльника. Количество высаженных пыльников варьировало по образцам от 254 шт. у комбинации Восход x Аргамак до 1466 шт. у Трио x Абсолют (табл. 1).

Таблица 1. Показатели андрогенной способности в культуре пыльников *in vitro* образцов риса
Table 1. Androgenic capacity indices in *in vitro* anther culture of rice samples

№	Комбинация	Название образца	Количество пыльников, шт.	Количество каллусов всего, шт.	Частота каллусообразования на 100 пыльников, %
1	3896	Вальс x Вирабан	464	0	0,0
2	3961	Вектор x Вирабан	1095	0	0,0
3	3934	Восход x Аргамак	254	246*	96,9
4	3945	Диалог x Аргамак	1195	71	5,9
5	3950	Злата x Аргамак	390	0	0,0
6	3941	Классик x Вирабан	494	568*	115,0
7	3898	Ленарис x Аргамак	1428	0	0,0
8	3957	Патриот x Аргамак	1167	83	7,1
9	3889	Престиж x Вирабан	912	0	0,0
10	3958	Рапан 2 x Аргамак	1246	354*	28,7
11	3966	Рубин x Аргамак	570	0	0,0
12	3937	Трио x Абсолют	1466	10	0,7
13	3892	Трио x Боярин	649	65	10,0
14	3962	Красноголовка	1200	437*	36,4
15	3938	(Inbara-3 x Новатор) x Вирабан	1128	94	8,3
16	3921	IR52713-2B-8-2B x Новатор	569	40	7,0
17	3923	IR52713-2B-8-2B-1-2 x Новатор	506	0	0,0
18	3922	IR86385-248-2-1-B x Контакт	989	819*	82,8
Сумма			15722,0	2712	391,0
Среднее			873,4	150,6	21,7
Стандартное отклонение			385,1	226,4	36,1

Примечание. * – достоверно на 5%-м уровне значимости.

Пролиферация клеток по образцам риса значительно отличалась. Количество каллусов варьировало у гибридов от 0 до 819 шт. Частота каллусообразования на 100 пыльников изменялось в пределах от 0 до 115 %. Наибольшими значениями признака характеризовались гибриды IR86385-248-2-1-B x Контакт (819 шт., 82,8%), Восход x Аргамак (246 шт., 96,9%) и Классик x Вирабан (568 шт., 115,0%). Установлено, что не все образцы риса сформировали каллус, а только 11 из всех изученных (61 %), а 7 образцов (39 %) не были отзывчивы на индукцию.

Наблюдали разные типы морфогенеза у образцов риса в условиях *in vitro* на регенерационной среде. Эти процессы связаны с реализацией свойства totipotентности растительных клеток – способности одной клетки развиваться в целый организм. Часть каллусов в опыте имела зеленую окраску, плотную консистенцию с проявлением признаков дифференциации и последующим образованием полноценных растений. На других каллусах наблюдали геммогенез (почки, ростки) или ризогенез (корни) (рис. 1).

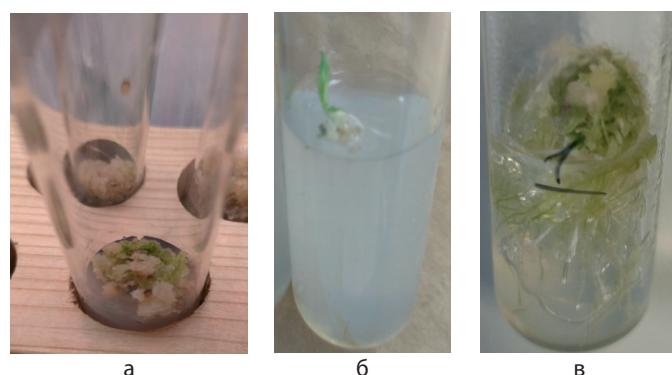


Рис. 1. Типы морфогенеза *in vitro* образцов риса:
Fig. 1. Types of morphogenesis in *in vitro* rice samples:
 а – зеленый морфогенный каллус, б – каллус с ростком, в – каллус с корнем

а – green morphogenic callus, б – callus with a sprout, в – callus with a root

Установлено, что 11 образцов сформировали каллусы с зелеными очагами (всего 642 шт., 13,3 % на 100 каллусов). Наибольшие значения частоты образования каллусов с зелеными очагами от общего их количества отмечены

у гибридных комбинаций Рапан 2 x Аргамак – 114 шт. (31,8 %), Классик x Вирасан – 155 шт. (27,3 %), IR86385-248-2-1-B x Контакт – 217 шт. (26,5 %) (рис. 2).



Примечание. * – достоверно на 5%-м уровне значимости.

Рис. 2. Частота геммогенеза образцов риса в культуре пыльников *in vitro*:

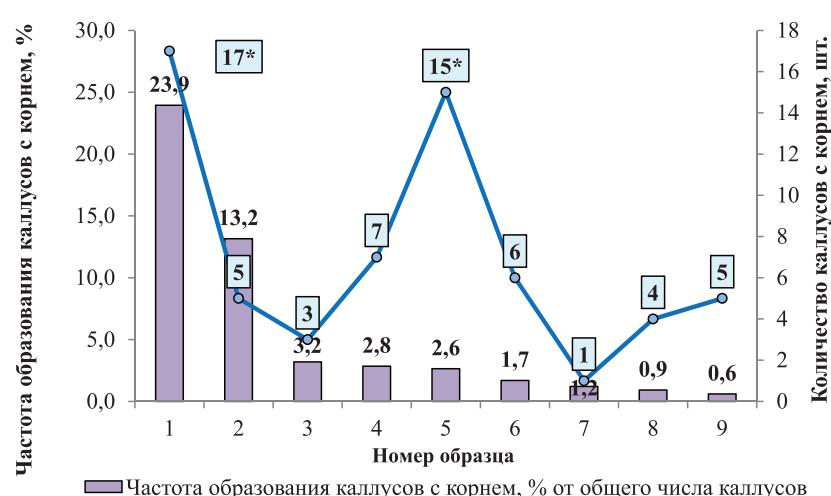
1 – IR52713-2B-8-2B x Новатор, 2 – Рапан 2 x Аргамак, 3 – Диалог x Аргамак, 4 – Классик x Вирасан, 5 – IR86385-248-2-1-B x Контакт, 6 – Восход x Аргамак, 7 – (Inbara-3 x Новатор) x Вирасан, 8 – Патриот x Аргамак, 9 – Трио x Абсолют, 10 – Красноголовка, 11 – Трио x Боярин

Fig. 2. Gemmogenesis frequency of rice samples in *in vitro* anther culture:

1 – IR52713-2B-8-2B x Novator, 2 – Rapan 2 x Argamak, 3 – Dialog x Argamak, 4 – Klassik x Virasan, 5 – IR86385-248-2-1-B x Kontakt, 6 – Voskhod x Argamak, 7 – (Inbara-3 x Novator) x Virasan, 8 – Patriot x Argamak, 9 – Trio x Absolut, 10 – Krasnogolovka, 11 – Trio x Boyarin

В процессе ризогенеза у образцов риса в культуре пыльников *in vitro* часть каллусов индуцировало развитие корней. Активность закладки корневых зачатков и развития кор-

невой системы зависит от генотипа и гормонального состава среды. Ризогенез наблюдали у 9 образцов риса (рис. 3).



Примечание. * – достоверно на 5%-м уровне значимости.

Рис. 3. Частота ризогенеза образцов риса в культуре пыльников *in vitro*:

1 – Диалог x Аргамак, 2 – IR52713-2B-8-2B x Новатор, 3 – (Inbara-3 x Новатор) x Вирасан, 4 – Восход x Аргамак, 5 – Классик x Вирасан, 6 – Рапан 2 x Аргамак, 7 – Патриот x Аргамак, 8 – Красноголовка, 9 – IR86385-248-2-1-B x Контакт

Fig. 3. Rhizogenesis frequency of rice samples in *in vitro* anther culture:

1 – Dialog x Argamak, 2 – IR52713-2B-8-2B x Novator, 3 – (Inbara-3 x Novator) x Virasan, 4 – Voskhod x Argamak, 5 – Klassik x Virasan, 6 – Rapan 2 x Argamak, 7 – Patriot x Argamak, 8 – Krasnogolovka, 9 – IR86385-248-2-1-B x Kontakt

Максимальную частоту образования каллусов с корнем наблюдали у гибрида Диалог x Аргамак – 23,9% (17 шт.), а минимальную – у IR86385-248-2-1-B x Контакт – 0,6% (5 шт.).

Главный оценочный показатель эффективности культуры пыльников *in vitro* риса – соотношение количества растений-регенерантов к количеству культивируемых пыльни-

ков. Общее количество растений-регенерантов составило 245 шт. с частотой регенерации в среднем по опыту 1,6% на 100 пыльников. Варьирование по образцам составило 0–15,5% на 100 пыльников. В процессе культивирования каллусов на регенерационной среде получено 137 зеленых и 108 альбиносных растений (рис. 4).

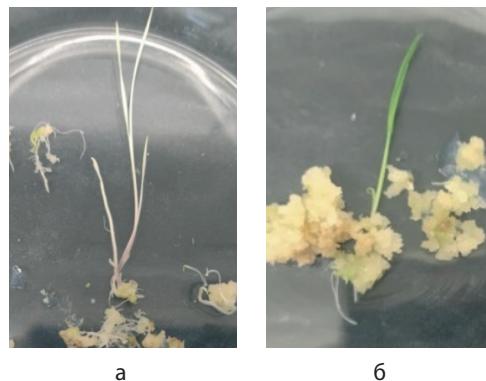


Рис. 4. Растения-регенеранты риса: а – альбинос, б – зеленое растение
Fig. 4. Regenerated rice plants: a – albino, b – green plant

Максимальное количество растений получено у образца риса (IR86385-248-2-1-B) x Контакт – 152 шт., в том числе зеленых расте-

ний 115 шт. с частотой на 100 новообразований 15,5%, а альбиносов – 37 шт., 5,0% (рис. 5).

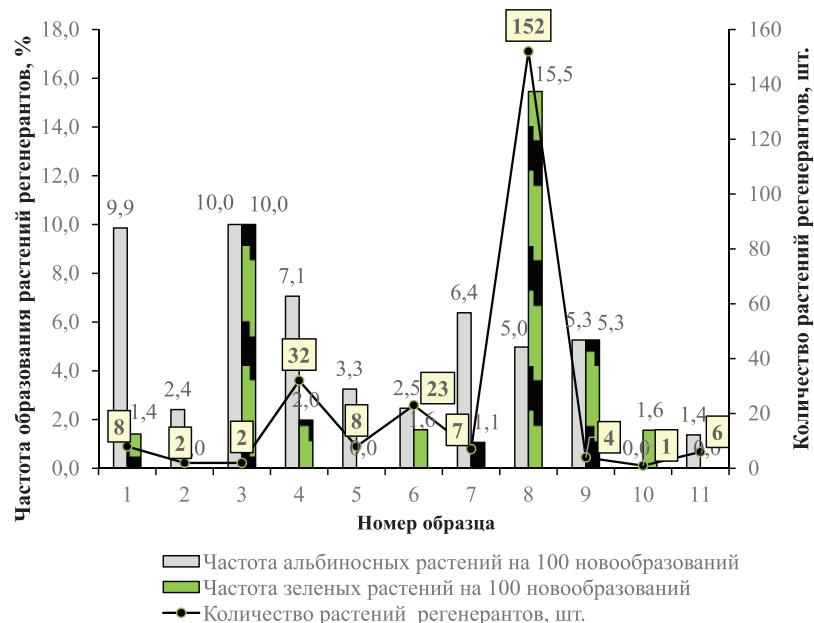


Рис. 5. Эффективность регенерации растений на 100 новообразований в андрогенезе *in vitro* гибридов риса:
1 – Диалог x Аргамак, 2 – Патриот x Аргамак, 3 – Трио x Абсолют, 4 – Рапан 2 x Аргамак, 5 – Восход x Аргамак,
6 – Классик x Вирасан, 7 – (Inbara-3 x Новатор) x Вирасан, 8 – IR86385-248-2-1-B x Контакт,
9 – IR52713-2B-8-2B x Новатор, 10 – Трио x Боярин, 11 – Красноголовка

Fig. 5. Plant regeneration efficiency per 100 new formations in *in vitro* androgenesis of rice hybrids:
1 – Dialog x Argamak, 2 – Patriot x Argamak, 3 – Trio x Absolut, 4 – Rapan 2 x Argamak, 5 – Voskhod x Argamak,
6 – Klassik x Virasan, 7 – (Inbara-3 x Novator) x Virasan, 8 – IR86385-248-2-1-B x Kontakt,
9 – IR52713-2B-8-2B x Novator, 10 – Trio x Boyarin, 11 – Krasnogolovka

У образцов Рапан 2 x Аргамак и Классик x Вирасан получено 32 и 23 растения-регенеранта, однако значение частоты регенерации зеленых растений на 100 новообразований было незначительным – 2,0 и 1,6% соответственно.

Коэффициент корреляции между количеством каллусов и растений риса составил $r = 0,81 \pm 0,09$ (тесная положительная связь) (рис. 6).

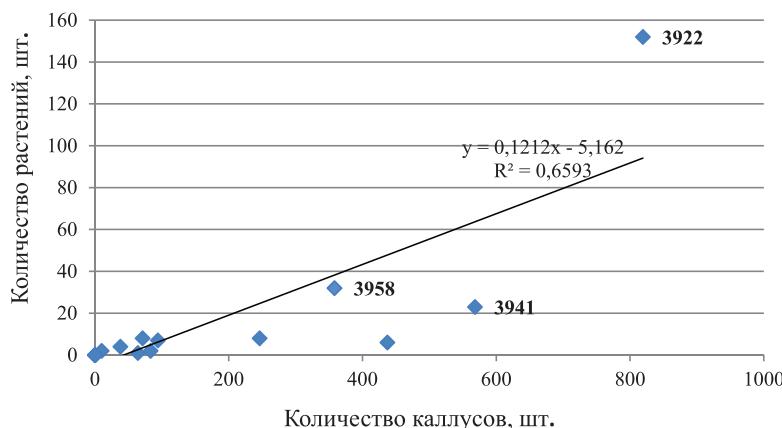


Рис. 6. Корреляционная взаимосвязь между выходом числа растений и количеством каллусов риса: 3958 (Рапан 2 x Аргамак), 3941 (Классик x Вирасан), 3922 (IR86385-248-2-1-B x Контакт)

Fig. 6. Correlation between plant productivity and a number of rice calli: 3958 (Rapan 2 x Argamak), 3941 (Klassik x Virasan), 3922 (IR86385-248-2-1-B x Kontakt)

График регрессии позволил оценить, как изменение количества каллусов сказывается на выходе растений. Если провести вверх перпендикуляр из значения 200 на оси абсцисс, он пересечет линию регрессии в точке горизонтальной проекции на ось ординат и составит около 20. Таким образом, при увеличении количества каллусов на 200 шт. число растений увеличивается на 20 шт.

Наибольшее количество каллусов и высокий выход растений обнаружены у трех гибридов: Классик x Вирасан – 568 и 23 шт., Рапан 2 x Аргамак – 358 и 32 шт. и IR86385-248-2-1-B x Контакт – 819 и 152 шт. соответственно. Чем больше изучаемый образец способен образовывать каллусов, тем выше выход растений. Эти результаты показали, что эффективность культуры пыльников *in vitro* трех генотипов в получении растений-регенерантов была лучше, чем у остальных образцов.

Зеленые растения-регенеранты, сформировавшие два и более листа, а также хорошую корневую систему, высажены в сосуды с почвой. Пробирочные растения, длительное время находившиеся в стерильных условиях (*in vitro*), при переходе в нестерильные (*in vivo*) подвергаются стрессовому воздействию. Это может привести к остановке в росте, отмиранию листьев и гибели растений. После адаптации растений к почвенным условиям к фазе выметывания осталось 58 растений. Ключевым шагом в применении метода культуры пыльников в селекционной программе является оценка уровня пloidности растений-регенерантов. Частое явление в процессе андрогенеза *in vitro* при получении удвоенных гаплоидов риса – спонтанное удвоение хромосом (Ahmadi et al., 2020), что подтверждается и в наших исследованиях. Полученные зеленые растения-регенеранты были разделены по морфологическим признакам на 3 группы: гаплоиды, удвоенные гаплоиды и тетраплоиды (рис. 7).



Рис. 7. Растения-регенеранты риса в теплице: а – тетраплоид; б – удвоенный гаплоид; в – гаплоид

Fig. 7. Regenerated rice plants in a greenhouse: a – tetraploid; b – doubled haploid; c – haploid

Наибольшее количество растений-регенерантов (41 шт.) получено у гибрида (IR86385-248-2-1-B) x Контакт, из них 4 шт. – удвоенные гаплоиды, а остальные 37 шт. – гаплоиды. Образец Рапан 2 x Аргамак представлен двумя тетраплоидами и одним гаплоидом. Гибрид Классик x Вирасан образовал только 9 гаплоидных растений, еще у пяти образцов риса получено по одному гаплоидному растению.

Гаплоидные растения-регенеранты риса характеризовались полной стерильностью метелок, коротким стеблем и узкими листьями. Тетраплоидные растения-регенеранты в сравнении с гаплоидными и удвоенными гаплоидами имели более длинный стебель, широкие листья и длинную метелку (Kostylev et al. 2023). Тетраплоиды были частично фертильными (5 %), удвоенные гаплоиды – высоко фертильными (84,5 %). На рисунке 8 представлены метелки и колоски растений-регенерантов.



Рис. 8. Морфологические признаки метелок и колосков растений-регенерантов риса разного уровня пloidности:

а – тетраплоид; б – удвоенный гаплоид; в – гаплоид
Fig. 8. Morphological traits of panicles and spikelets of regenerated rice plants of different ploidy levels:
a – tetraploid; b – doubled haploid; c – haploid

Проведенная морфологическая оценка полученных растений-регенерантов являлась достаточно надежной для отличия удвоенных

гаплоидов от растений других уровней пloidности. В таблице 2 представлены минимальные, максимальные и средние значения растений-регенерантов по изученным признакам в зависимости от уровня пloidности.

Варьирование по высоте у растений-регенерантов было от 30,0 до 88,0 см, в среднем величина этого признака составила у гаплоидов 41,3 см, у удвоенных гаплоидов – 65,1 см и тетраплоидов – 72,4 см. В целом растения хорошо кустились, образуя метелки от 2,0 до 19,0 шт. на одном растении. Длина метелки в среднем у гаплоидов составила 10,3 см, у удвоенных гаплоидов – 13,6 см, а у тетраплоидов – 15,0 см. Количество колосков на метелке у гаплоидов варьировало от 61,0 до 129,0 шт. (в среднем 95,0 шт.), у удвоенных гаплоидов – от 49,0 до 135,0 шт. (в среднем 98,0 шт.), у тетраплоидов – от 28,0 до 51,0 шт. (в среднем 34,2 шт.). Растения разного уровня пloidности существенно различались по размеру колосков. В среднем длина колосков варьировала от 4,0 мм (у гаплоидов) до 10,0 мм (у тетраплоидов), а ширина – от 3,0 мм (у гаплоидов) до 7,0 мм (у тетраплоидов). Гаплоидные растения-регенеранты были полностью стерильные, тетраплоидные в среднем образовали два зерна на метелку. Варьирование по количеству зерен с одной метелки у удвоенных гаплоидных растений составило от 61,0 до 100,0 шт. Полученный семенной материал был включен в селекционный процесс для получения новых сортов риса.

Таблица 2. Морфологические особенности растений-регенерантов риса разного уровня пloidности

Table 2. Morphological features of regenerated rice plants of different ploidy levels

Морфологический признак		Гаплоиды	Удвоенные гаплоиды	Тетраплоиды
Высота растения, см	min	30,0	43,0	58,0
	max	53,0	67,0	88,0
	среднее	41,3	65,1	72,4
Количество метелок с растения, шт.	min	2,0	5,0	4,0
	max	19,0	16,0	13,0
	среднее	10,0	10,0	8,0
Длина метелки, см	min	7,0	9,0	12,0
	max	13,5	16,0	19,0
	среднее	10,3	13,6	15,0
Количество колосков на одной метелке, шт.	min	61,0	49,0	28,0
	max	129,0	135,0	51,0
	среднее	95,0	98,0	34,2
Размер колосков, мм				
длина	min	3,0	6,0	9,0
	max	5,0	8,0	11,0
	среднее	4,0	7,0	10,0
ширина	min	2,0	5,0	4,0
	max	4,0	7,0	8,0
	среднее	3,0	6,0	7,0
Количество зерен с одной метелки, шт.	min		61,0	0,0
	max	0,0	100,0	4,0
	среднее		83,0	2,0

Выводы. Получение удвоенных гаплоидов проводили на основе 18 образцов риса. На индукцию отзовались 11 образцов (61 %). Высокая частота каллусообразования наблюдалась у гибридных комбинаций IR86385-248-2-1-B x Контакт (819 шт., 82,8 %), Классик x Вирабан (568 шт., 115 %), Восход x Аргамак (246 шт., 96,9 %). Выявлены разные типы морфогенеза на регенерационной среде, что, видимо, связано с генетическим полиморфизмом гибридного материала. Наибольшие значения частоты образования каллусов с зелеными очагами от общего их количества отмечены у гибридных комбинаций Рапан 2 x Аргамак (114 шт., 31,8 %), Классик x Вирабан (155 шт., 27,3 %), (IR86385-248-2-1-B) x Контакт (217 шт., 26,5 %). Частота регенерации растений в среднем составила 1,6 % на 100 пыльников. Всего получено 137 зеленых растений. Коэффициент корреляции подтвердил, что чем больше образец риса способен давать каллусы, тем выше выход растений ($r = 0,81 \pm 0,09$). Наибольшее ко-

личество зеленых растений после адаптации к почвенным условиям получено у гибридного образца (IR86385-248-2-1-B) x Контакт (41 шт.). Удвоение хромосом происходило спонтанно. Характеристика растений по уровню полидности проведена по морфологическим признакам, в том числе метелок и колосков, она была достаточно информативна. Удвоенные гаплоиды характеризовались высокой fertильностью метелок (84,5 %). В дальнейший селекционный процесс включены линии из комбинаций IR86385-248-2-1-B x Контакт и Рапан 2 x Аргамак.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств федерального бюджета в рамках Госзадания ФГБНУ «АНЦ» Донской» (№ 0505-2025-0007 «Использование методов молекулярной биологии и биотехнологии для контроля целевых генов селекционного материала и создания дигаплоидных линий зерновых культур»).

Библиографический список

1. Илюшко М.В., Ромашова М.В., Гученко С.С. Оценка частоты внутрикаллусной изменчивости андрогенных удвоенных гаплоидов риса (*Oryza sativa* L.) по генам устойчивости к пирокуляриозу // Сельскохозяйственная биология. 2023. Т. 58, № 3. С. 554–566. DOI:10.15389/agrobiology.2023.3.554rus
2. Савенко Е.Г., Мухина Ж.М., Глазырина В.А., Шундриня Л.А. Оптимизация клеточных технологий *in vitro* для ускоренного получения генераций риса *Oryza sativa* L. // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2022. № 144. С.114–121. DOI: 10.36305/0513-1634-2022-144-114-121
3. Ahmadi B., Ebrahimzadeh H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants // Plant cell reports. 2020. Vol. 39(3). P. 299–316. DOI: 10.1007/s00299-020-02509-z
4. Gao R., Zong Y., Zhang S., Guo G., Zhang W., Chen Z., Lu R., Liu C., Wang Y., Li Y. Efcient isolated microspore culture protocol for callus induction and plantlet regeneration in japonica rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Methods. 2024. Vol. 20. P. 76. DOI:10.1186/s13007-024-01189-0
5. Gueye T., Ndir K.N. *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material // Sci Res Essays. 2010. Vol. 5. P. 709–713.
6. Kyum M., Kaur H., Kamboj A., Goyal L. Strategies and prospects of haploid induction in rice (*Oryza sativa*) // Plant Breeding. 2022. Vol. 141 (1). P.1-11. DOI: 10.1111/pbr.12971
7. Kostylev P., Kainina N., Vozhzhova N., Golubova V., Chertkova N. Creation of Rice Doubled Haploids Resistant to Prolonged Flooding Using Anther Culture // Plants. 2023. Vol. 12. P. 3681. DOI:10.3390/plants12213681
8. Maharani A., Fanata W.I.D., Laeli F.N., Kim K.M., Handoyo T. Callus Induction and Regeneration from Anther Cultures of Indonesian Indica Black Rice Cultivar // Journal of Crop Science and Biotechnology. 2020. Vol. 23 (1). P. 21–28. DOI:10.7324/JABB.2019.70216
9. Pattnaik S.S., Dash B., Bhuyan S.S., Katara J.L., Parameswaran C., Verma R., Ramesh N., Samantaray S. Anther culture efficiency in quality hybrid rice: A comparison between hybrid rice and its ratooned plants // Plants. 2020. Vol. 9(10). P. 1306. DOI: 10.3390/plants9101306
10. Tajedini S., Fakhen B., Niazian M., Mahdinezhad N., Ghanim A.M.A., Pour A.K., Ingelbrecht I., Shariatpanahi M. Efficient microspore embryogenesis and haploid induction in mutant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars // Journal of Plant Growth regulation. 2022. Vol. 42, Iss. 4. P. 2345–2359. DOI: 10.1007/s00344-022-10709-y
11. Tripathy, S.K. High-throughput doubled haploid production for indica rice breeding / S.K. Tripathy, J.M. Segui Simarro // Doubled haploid technology. Methods molecular biology. N.Y.: Humana. 2021. Vol. 2287. P. 343–363. DOI: 10.1007/978-1-0716-315-3_20
12. Tripathy S.K., Swain D., Mohapatra P.M., Prusti A.M., Sahoo B., Panda S., Dash M., Chakma B., Behera S.K. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.) // Journal of Applied Biology and Biotechnology. 2019. Vol. 7(02). P. 87–92. DOI: 10.7324/JABB.2019.70216

References

1. Ilyushko M.V., Romashova M.V., Guchenko S.S. Otseňka chastoty vnutrikallusnoi izmenchivosti androgennykh udvoennykh gapoloidov risa (*Oryza sativa* L.) po genam ustoichivosti k pirikulyariozu [Estimation of intracallus variation frequency in androgenic doubled rice haploids (*Oryza sativa* L.) for blast resistance genes] // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. 2023. T. 58, № 3. S. 554–566. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.3.554rus
2. Savenko E.G., Mukhina Zh.M., Glazyrina V.A., Shundrina L.A. Optimizatsiya kletochnykh tekhnologii *in vitro* dlya uskorenennogo polucheniya generatsii risa *Oryza sativa* L. [Optimization of *in vitro* cell

- technologies for accelerated production of *Oryza sativa* L. rice generations] // Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada. 2022. № 144. S.114–121. DOI: 10.36305/0513-1634-2022-144-114-121
3. Ahmadi B., Ebrahimzadeh H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants // Plant cell reports. 2020. Vol. 39(3). P. 299–316. DOI: 10.1007/s00299-020-02509-z
4. Gao R., Zong Y., Zhang S., Guo G., Zhang W., Chen Z., Lu R., Liu C., Wang Y., Li Y. Efcient isolated microspore culture protocol for callus induction and plantlet regeneration in japonica rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Methods. 2024. Vol. 20. P. 76. DOI:10.1186/s13007-024-01189-0
5. Gueye T., Ndir K.N. *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material // Sci Res Essays. 2010. Vol. 5. P. 709–713.
6. Kyum M., Kaur H., Kamboj A., Goyal L. Strategies and prospects of haploid induction in rice (*Oryza sativa*) // Plant Breeding. 2022. Vol. 141(1). P. 1–11. DOI: 10.1111/pbr.12971
7. Kostylev P., Kainina N., Vozhzhova N., Golubova V., Chertkova N. Creation of Rice Doubled Haploids Resistant to Prolonged Flooding Using Anther Culture // Plants. 2023. Vol. 12. P. 3681. DOI: 10.3390/plants12213681
8. Maharanı A., Fanata W.I. D., Laeli F.N., Kim K.M., Handoyo T. Callus Induction and Regeneration from Anther Cultures of Indonesian Indica Black Rice Cultivar // Journal of Crop Science and Biotechnology. 2020. Vol. 23(1). P. 21–28. DOI:10.7324/JABB.2019.70216
9. Pattnaik S.S., Dash B., Bhuyan S.S., Katara J.L., Parameswaran C., Verma R., Ramesh N., Samantaray S. Anther culture efficiency in quality hybrid rice: A comparison between hybrid rice and its ratooned plants // Plants. 2020. Vol. 9(10). P. 1306. DOI: 10.3390/plants9101306
10. Tajedini S., Fakhen B., Niazian M., Mahdinezhad N., Ghanim A.M.A., Pour A.K., Ingelbrecht I., Shariatiapanahi M. Efficient microspore embryogenesis and haploid induction in mutant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars // Journal of Plant Growth regulation. 2022. Vol. 42. Iss. 4. P. 2345–2359. DOI: 10.1007/s00344-022-10709-y
11. Tripathy, S.K. High-throughput doubled haploid production for indica rice breeding / S.K. Tripathy, J.M. Segui Simarro // Doubled haploid technology. Methods molecular biology. N.Y.: Humana. 2021. Vol. 2287. P. 343–363. DOI: 10.1007/978-1-0716-315-3_20
12. Tripathy S.K., Swain D., Mohapatra P.M., Prusti A.M., Sahoo B., Panda S., Dash M., Chakma B., Behera S.K. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.) // Journal of Applied Biology and Biotechnology. 2019. Vol. 7(02). P. 87–92. DOI: 10.7324/JABB.2019.70216

Поступила: 16.10.25; доработана после рецензирования 11.11.25; принята к публикации:13.11.25.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за plagiat.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Калинина Н.В. – постановка цели и задач, формирование методологии исследования и концепции статьи, финальная доработка текста; Донцова В.Ю., Черткова Н.Г. – выполнение лабораторных опытов, сбор, анализ литературных и лабораторных данных, подготовка рукописи; Костылев П.И. – предоставление материала для исследований, критический анализ текста.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.